

⑫ 公開特許公報(A)

平3-155797

⑤ Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 平成3年(1991)7月3日

C 12 P 21/08

8214-4B

C 12 N 9/64

Z

7823-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全10頁)

⑭ 発明の名称 血液凝固第Ⅶ因子または活性型血液凝固第Ⅶ因子の調製方法

⑰ 特 願 平1-286944

⑱ 出 願 平1(1989)11月2日

優先権主張 ⑳ 平1(1989)8月2日㉑ 日本(JP)㉒ 特願 平1-202239

⑳ 発 明 者 今 村 匡 伸 熊本県熊本市若葉3丁目12-16

㉑ 発 明 者 大 山 周 三 熊本県菊池郡西合志町須屋1548-11

㉒ 発 明 者 中 垣 智 弘 熊本県菊池郡合志町豊岡2527-311

㉓ 発 明 者 船 津 昭 信 熊本県熊本市清水町麻生田1775-7

㉔ 出 願 人 財団法人化学及血清療法研究所 熊本県熊本市清水町大窪668番地

㉕ 代 理 人 弁理士 筒 井 知
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

血液凝固第Ⅶ因子または(および)活性型血液凝固第Ⅶ因子の調製方法

2. 特許請求の範囲

(1) 血液凝固第Ⅶ因子(FⅦ)または(および)活性型血液凝固第Ⅶ因子(FⅦa)に対して特異的な結合性を有し、且つ該結合性が2価の金属陽イオンの存在濃度に依存するモノクローナル抗体。

(2) 前記金属陽イオンがカルシウムイオン、マンガンイオン、バリウムイオン、マグネシウムイオン、ストロンチウムイオンから選ばれる特許請求の範囲第(1)項記載のモノクローナル抗体。

(3) 1 mM以下のカルシウムイオンの存在下でFⅦまたは(および)FⅦaに対して特異的な結合性を有し、該結合性がカルシウムイオン濃度に依存する特性を有する特許請求の範囲第(1)項記載のモノクローナル抗体。

(4) 工業技術院微生物工業技術研究所に寄託番号10834号(FERM P-10834)で寄託されているハイブリドーマにより産生される特許請求の範囲第(1)項記載のモノクローナル抗体。

(5) 前記モノクローナル抗体を適当な担体に固定化して吸着体とし、FⅦまたは(および)FⅦaを含有する出発材料を前記金属陽イオンの存在下、該吸着体に接触させてFⅦまたは(および)FⅦaを該モノクローナル抗体に結合させ、金属キレート剤を含有する溶液を用いてFⅦまたは(および)FⅦaを該モノクローナル抗体から溶離させる工程を含むことを特徴とするFⅦまたは(および)FⅦaの調製方法。

(6) FⅦまたは(および)FⅦaを含有する採取直後の血漿のカルシウムイオン濃度を1 mM以下に抑制し、さらに人為的な金属陽イオンの添加を行わずに、過剰の金属陽イオンによるFⅦまたは(および)FⅦaへの影響を回避することを特徴とする特許請求の範囲第(5)項記載のFⅦまたは(および)FⅦaの調製方法。

(7) F VIIまたは(および)F VII aを含有する出発材料を前記金属陽イオンの存在下、前記モノクローナル抗体を適当な担体に固定化した吸着体に接触させ、F VIIまたは(および)F VII aを該吸着体に吸着させる工程、並びに金属キレート剤を含有する溶液を用いてこれらを該モノクローナル抗体から分離させる工程を室温で行なうことによって、特定のF VIIからF VII aへの活性化工程を必要としないF VII aの調製方法。

(8)前記F VIIまたは(および)F VII aを含有する出発材料がプロトロンビンファミリーを高濃度で含有するペーストをカルシウムイオン含有緩衝液を用いて室温で溶解したものである特許請求の範囲第(7)項記載のF VII aの調製方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明はヒト血液凝固第VII因子コンホメーション特異性モノクローナル抗体、ならびに該抗体を用いる血液凝固第VII因子、または(および)活性型

シウムイオンにより触媒される反応である血液凝固第IX因子(F IX)の活性化がある。次に、活性型血液凝固第IX因子(F IXa)は活性型血液凝固第VII因子(F VII a)、リン脂質およびカルシウムイオンの存在下で血液凝固第X因子(F X)の活性化に関与する。一方、外因性経路は血漿因子、および組織抽出物中に存在する成分が関与する。前述のプロエンザイムの1つである血液凝固第VII因子(F VII)は、活性型血液凝固第VII因子(F VII a)への変換の後に、組織因子およびカルシウムイオンの存在下でF XをF Xaに転換することにより、血液凝固の外因性経路に関与する。F Xaは次に活性型血液凝固第V因子(F V a)、カルシウムイオンおよびリン脂質の存在下でプロトロンビンをトロンビンに転換する。F XのF Xaへの活性化は内因性経路および外因性経路の両者に共通の現象であるから、F VIIが不足しているかまたはF VIIの阻害物質(インヒビター)を有する血友病患者の治療のためにF VII aを利用することができる。さらに、F VII aはF IXの活性化において役割を演ずることにより内因性経路に関与

血液凝固第VII因子の調製法に関する。

発明の背景

血液凝固は、最終的にフィブリンクロットを生じさせる種々の血液成分または因子の複雑な相互作用からなる過程である。一般に、凝固カスケードと称される現象に関与する血液成分は酵素的に不活性なタンパク質であるプロエンザイム(pro-enzyme)またはザイモゲン(zymogen)であり、これらのタンパク質は、活性化された別の凝固因子の作用によりタンパク質分解酵素に転換される。こうして転換された凝固因子は一般に「活性化された因子」と称される。

血液の凝固を助長し、そしてそれによって正常な止血に関与する2つの独立した系が存在し、これらの系は各々、「内因性経路」および「外因性経路」と称されている。内因性経路は血漿中のみ存在する因子の利用を介してトロンビンの形成を導く反応を意味する。該経路における中間的現象として活性型血液凝固第XI因子(F XIa)およびカル

することを示唆する証拠も存在する。F VIIのF VII aへの活性化はいくつかの異なる血漿プロテアーゼ、例えば、F X aおよび活性型血液凝固第XII因子(F XIIa)等により触媒される。

ところで血友病の補充療法において、F VIIおよびF IXを投与された個体は、これらのタンパク質に対する抗体をしばしば生じさせ、該抗体の存在のために止血管理は甚だ困難となる。この問題を経験する患者は通常、F VII aを含有する活性凝固酵素および不活性凝固酵素的混合物からなることが知られている活性化されたプロトロンビン複合体により治療される。

さらに、最近の研究によれば、投与された少量のF VII aがその血漿中に高レベルの抗F VII抗体を有する血友病患者の重度の進行性出血を抑制するために有効であることが明らかになっている

(Hedner, et al., J. Clin. Invest. 71, p.1936 (1983)).

F VIIは1本鎖糖蛋白でビタミンK依存性凝固因子(プロトロンビン、血液凝固第VII因子、血液凝固

第Ⅲ因子、血液凝固第Ⅹ因子、プロテインC、プロテインS、プロテインZからなり、これらは構造上の相同性が高くプロトロンビンファミリーとも呼ばれる)の1つである。生理的には、組織因子(Tissue Factor)と複合体を形成し、血液凝固の開始反応を担う重要な蛋白質である。また、FⅦaはFⅦのArg¹⁵²-Ile¹⁵³結合が限定分解を受け2本鎖になった糖蛋白で、その凝固活性はFⅦと比べ25倍程高いことが知られており、前述のように従来その止血管理が困難とされているFⅦおよびFⅨに対する抗体を有する血友病患者の治療に有用である。

従来の技術とその問題点

FⅦを調製するためには従来より各種の方法が提案されており、特に血漿由来のヒトFⅦを調製するべく多くの試みがなされている(Prydz, J. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1, p.101. (1964); Gladhaug, A. et al., Biochim. Biophys. Acta 215, p.105. (1970); Laake, K., et al., Thromb.

Res. 5, p.539. (1974); Schliffman, S., et al., Thromb Res. 6, p.273 (1975); Osterud, B., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, p.5260 (1977)). しかしながら、これらの調製法においてはFⅦの部分精製にとどまり、FⅦそのものを純粋に物質として単離するまでには至っていない。このような状況下、塩化バリウムによる吸着処理ならびに硫酸アンモニウムによる塩析沈澱法、イオン交換クロマト法およびゲル濾過法よりなる精製方法によりFⅦが良好に調製されることが報告された(Broze, Jr., G. J. et al., J. Biol. Chem. 255, p.1242 (1980))。従来、FⅦは血液中の濃度が極めて低く、また、前述の類似する他のプロトロンビンファミリーとの分離が容易ではないため、血漿からFⅦを工業的規模で単離することは困難であった。前述の方法は、血漿からの実験室規模でのFⅦの調製という点では優れた方法と考えられるが、工業的規模にこれを適用することは、なお種々の困難を伴う。

発明の構成および効果

上記問題点を克服するために、FⅦに対する抗体を調製し、該抗体を適当な担体に結合させて用いる免疫吸着クロマトグラフィーを利用する。FⅦまたは(および)FⅦaの調製方法が試みられた。特にモノクローナル抗体を用いる免疫吸着法はその特異性の高さにより有望視されるが、モノクローナル抗体を免疫吸着法に应用する場合、通常、高濃度のグアニジンあるいは尿素の様な変性剤を用いて、吸着した目的物質を溶出しなければならず、この点が大きな問題となっていた。すなわち、目的とする溶出物が血液凝固因子のごときプロテアーゼ等の場合、その活性を消失することが多く、医薬品の工業的規模の製造に应用するには、なお克服すべき大きな障壁が残っていた。

上述の問題点を解決するべく、本願発明者等は鋭意研究を重ねた結果、金属陽イオンの結合の有無に起因するコンフォメーションの差異を識別するFⅦおよび(または)FⅦaに対するモノクローナル抗体を見い出し、当該モノクローナル抗体を免

疫吸着クロマトグラフィーに應用して、強力な変性剤を用いることなく、目的とするFⅦおよび(または)FⅦaを溶出し精製することのできる本願発明を完成するに至った。すなわち、本発明に用いられるコンフォメーション特異性モノクローナル抗体を免疫吸着体として用いる場合、金属イオン存在下でFⅦを吸着させ、次いで吸着させたFⅦから該因子に結合した金属イオンをEDTAの様な金属キレート剤により除去すれば、FⅦは金属イオンと結合している時とは異なるコンフォメーションをとることになり、吸着体に対する親和性が消失し、FⅦが容易にかつ活性を損なうことなく溶出され、精製取得することができる。

また、本願発明者等は、当該コンフォメーション特異性モノクローナル抗体が、極めて低濃度の金属によるFⅦまたは(および)FⅦaのコンフォメーション変化を認識し得ることを見いだした。従来、出発材料としてのFⅦまたは(および)FⅦaを含有する血漿は、血漿自体に含有される金属に起因する凝固を抑制するために、クエン酸塩等の添

加によって含有される金属は捕捉されている。比較的高濃度域での金属存在下のコンフォメーション変化を認識する。金属依存性モノクローナル抗体を用いる凝固因子の調製においては、人為的な金属イオンの添加は不可欠であり、この操作を行なうことによる目的とする凝固因子への悪影響は避け難いものであった。

本願発明によって見いだされた低濃度の金属によるF VIIのコンフォメーション変化を認識し得る当該モノクローナル抗体を利用すれば、採取直後の血液にEDTAあるいはEGTAのような金属キレート剤を添加することにより、血漿中のカルシウムイオンに代表される金属イオン濃度は低濃度に制御され、この血漿を前記モノクローナル抗体を固定化した免疫吸着体に通液することによって、凝固を生じることなく、より天然のものに近いF VIIまたは(および)F VIIaを調製することができる。上述のように、従来、不可能であったF VIIの好適な工業的調製が、本発明により初めて可能となった。

従来、F VII精製後、F XIIaあるいはリン脂質、カルシウム陽イオン共存下F Xaで活性化する方法により調製していたが、活性化に用いる上記プロテアーゼの調製が煩雑なうえ、その除去法も大きな問題となる。しかしながら、上記の方法によれば、原料であるヒト血漿から、F VIIのみならずF VIIaを本願発明のモノクローナル抗体カラムを用いることにより簡便かつ高収率に得られるという点で、本発明の方法は従来にない極めて画期的なものと結論することができよう。

本発明を利用した高純度F VIIおよび(または)F VIIaの調製方法の諸工程の一例を以下に示す。

①まず、本発明によって得られたカルシウムイオンをはじめとする金属陽イオンの結合の有無に起因する、F VIIおよび(または)F VIIaの微細なコンフォメーション変化の差異を識別する性質を有するモノクローナル抗体をマトリックス(担体)に固定化したカラムに、該金属イオンの存在条件下、F VIIおよび(または)F VIIaを含有する出発材料を通液する。上記出発材料としては、特に制約はない

さらに特筆すべきことに、本発明の方法に従えば、新鮮血漿を陰イオン交換体で処理して得られる、Prothrombin family rich fraction (F VIIペーストと呼ぶ)を原料として一段階でF VIIのみならずF VIIaを調製することができる。例えば、F VIIペーストを溶解する時の温度やプロテアーゼインヒビター(ATIII-ヘパリン、ベンズアミジン等)添加の有無等の条件を選択することにより、コンフォメーション特異性抗F VIIおよび(または)F VIIaモノクローナル抗体カラム処理後の溶出面分をF VIIとして得ることもできるしF VIIaとして得ることもできる。すなわち、F VIIペーストを溶解する際にプロテアーゼインヒビターを添加し、かつ低温下で処理し、該出発原料を低温下で、本発明のコンフォメーション特異性モノクローナル抗体カラムに適用すれば溶出面分はF VIIとして、また、出発原料であるF VIIペーストをプロテアーゼ未添加の条件で室温下で溶解し、室温条件でコンフォメーション特異性モノクローナル抗体カラム処理すると溶出面分はF VIIaとして得ることができる。F VIIaは

が例えば、血漿および組織DNA技術によって産生されたF VIIを含有する材料等が適用される。

②次に、カラムに非特異的に結合した夾雑タンパク質を除去するために、適切な洗浄用緩衝液でカラムを充分洗浄する。

③カラムに結合している活性を有するF VIIおよび(または)F VIIaを、EDTA等の金属キレート剤を含有する溶液で溶出する。

④溶離したF VIIおよび(または)F VIIaを含有する溶出液は、透析やゲル濾過法により必要に応じて脱塩、緩衝液置換を行なう。

⑤該凝固因子含有溶液の濃縮には、既知の方法である限外濾過法、凍結乾燥法、および陰イオン交換クロマトグラフィー等の方法を用いることができる。

なお、本発明に用いられるF VIIおよび(または)F VIIaに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは工業技術院微生物工業技術研究所(微工研)に10834号(FERM P-10834)の寄託番号で寄託されている。

以下、本発明の特徴をさらに明らかにするため、実施例に沿って詳述する。

実施例

コンフォーメーション特異性抗F VIIモノクローナル抗体の調製

(1)第VII因子の精製

新鮮凍結血漿を37℃で素早く融解した後、4℃においてゆっくり攪拌しながら1/10容の塩化バリウムを滴下し、2時間放置した。4000rpm、5分間4℃にて遠心処理を行ない沈澱を回収し、Tris-塩酸緩衝液に懸濁した。この溶液を30%~70%の硫酸アンモニウム塩析沈澱を行ない、得られた沈澱を再懸濁後、DEAE-セファローズクロマトグラフィーを行なった。

pH6.0のリン酸バッファーで0.05M→0.5Mの塩化ナトリウムの濃度勾配でF VIIを含む画分を得た。透析後、この画分をQAE-セファデックスカラムに通液し、洗浄後、塩化カルシウム含有緩衝液で溶出した。更にセファデックスG-100カラムでゲル濾過し、精製後、アミコンの限外濾過器で濃縮し

サブクラスの同定

上記(2)で得られた5種のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の抗原特異性を次のようにして測定した。

測定は、次の如くELISA法で行なった。

1. 抗原のコーティング

2枚のマイクロタイタープレートに10mMトリス-塩酸(pH=7.5)150mM NaClで2μg/μlに調製したヒトF VII(上記で精製したのと同じもの)50μlを添加し、37℃で60分間インキュベートした。

2. 洗浄

2mM CaCl₂及び2mM EDTAをそれぞれ含む、2通りの10mMトリス-塩酸(pH=7.5)、0.5M NaCl、0.1%Tween 20からなる緩衝液を調製し、1枚のマイクロタイタープレートは、2mM CaCl₂を含む緩衝液で、もう1枚のプレートは2mM EDTAを含む緩衝液でそれぞれ、4回ずつ洗浄した。

3. ブロッキング

1%ウシ血清アルブミンを含む10mMトリス-塩酸(pH=7.5)150mM NaCl溶液を調製し、その200μlを

た。精製したF VIIはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で単一バンドを示し、他の凝固因子の混入は認められなかった。

(2)モノクローナル抗体の調製

上記で得られた精製F VIIの50μgを50μlの生理食塩水に溶解し、アジュバントとしてDIFCO社のフロイントの完全アジュバント100μlを加えて油中水滴型としたものを基礎免疫抗原とした。また追加免疫用抗原として上記の精製F VII 50μgを50μlの生理食塩水に溶かして調製したものをを用いた。

BALB/Cマウス7週令(♀)を用い、基礎免疫原を接種後、追加免疫用抗原を60日目に免疫したマウスより得られたマウス脾臓細胞を通常の方法によりマウスミエローマ細胞(P3-X63-Ag8-U1)と融合させクローニングして第VII因子特異性モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ5種を得た。各々をマウス腹腔内で増殖させることによってハイブリドーマを大量に調製し、これより各モノクローナル抗体を得た。

(3)抗原特異性の測定およびイムノグロブリン・サブ

各プレートに添加し、37℃で30分間インキュベートした。

4. ハイブリドーマ上清添加

ハイブリドーマ上清40μlを各プレートの列毎に添加し、37℃で60分間インキュベートした。

5. 第2抗体及び発色

各プレートにペルオキシダーゼを結合した抗マウスIgGウサギ抗体50μlを添加し、25℃で60分間インキュベートした。その後o-フェニルジアミン溶液を100μl添加し、25℃で10分間反応させ、492nmの波長で吸光度を測定した。

結果は、第1表のとおりであり、いずれもF VII特異性であるが、その中でクローンNo.3~No.5はCa⁺⁺イオンとの結合によって生じるコンフォーメーションのみを特異的に認識することが判明した。なお、イムノグロブリンサブクラスの同定はゲル内沈降反応により行なった。その結果、今回得られたハイブリドーマより産生される抗体のサブクラスはすべてIgG1であった。

第 1 表

クローンNo.	ELISA (A492nm)		IgG の 97% クラス
	Ca ⁺⁺	EDTA	
1	0.110	0.080	IgG1
2	0.110	0.110	"
3	0.450	0.009	"
4	0.410	0.009	"
5	0.150	0.010	"

ープレートに37℃60分コーティングした。以下、ウシ血清アルブミンによるブロッキング、洗浄、モノクローナル抗体の添加、及び発色の手順は、前記(3)と同様である。全てのクローンは、2価のカルシウム陽イオンの存在下でF VIIのみに反応し、他の各凝固因子及びウシ血清アルブミンとは反応しなかった(第3-1表参照)。なお、金属キレート剤により系からカルシウム陽イオンを除去するとクローンNo. 3～5の第VII因子結合性は消失した(第3-2表参照)。

(4)他のビタミンK依存性凝固因子に対するモノクローナル抗体の反応性

前記(2)で得られた各モノクローナル抗体の抗原特異性を次の様にして更に確認した。実験は前記と同様にELISA法で行なった。確認する抗原として、プロトロンビン、F VII、F IX、F X、プロテインC、プロテインS及びウシ血清アルブミンを用いた。各々精製した抗原を10mM Tris-塩酸(pH=7.5) 0.1M NaClで5 µg/ mlに調製し、マイクロタイタ

第3-1表

モノクローナル抗体の他の凝固因子との反応
(Ca⁺⁺存在下)

クローンNo.	第VII因子	プロトロンビン	第IX因子	第X因子	プロテインC	プロテインS	ウシ血清アルブミン
1	+	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-	-

第3-2表

モノクローナル抗体の他の凝固因子との反応
(EDTA存在下)

クローンNo.	第VII因子	プロトロンビン	第IX因子	第X因子	プロテインC	プロテインS	ウシ血清アルブミン
1	+	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-

(6)モノクローナル抗体の他の金属イオンによるコンフォメーションに対する特異性の測定

実験は、前記(3)と同様にELISA法で行なった。前記(1)で精製したF VIIをマイクロタイタープレートにコーティングした。

MgCl₂、SrCl₂、BaCl₂、MnCl₂、CaCl₂(濃度はすべて2 mM)をそれぞれ含む5通りの10mM トリス-塩酸(pH=7.5) 0.5M NaCl、0.1% Tween 20からなる緩衝液を調製し、マイクロプレートの各列を上記5種類の金属イオンを含む緩衝液でそれぞれ4回ずつ洗浄した。以下、ウシ血清アルブミンによるブロッキング、モノクローナル抗体の第2抗体の添加及び発色の手順は、前記(3)と同じである。

結果を第4表に示した。

第4表

金属イオン クローンNo.	Mg	Sr	Ba	Mn	Ca	EDTA
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	-
4	-	-	-	±	+	-
5	-	-	-	±	+	-

その結果、金属の結合に起因するコンフォメーションを認識するクローンNo. 3～5の3種類のクローンのうちNo. 4および5はCa⁺⁺およびMn⁺⁺に特異性を有し、No. 3は表に見られるようにCa⁺⁺をはじめとする数種類の金属陽イオンが適用され得ることが判明した。

(7)モノクローナル抗体の結合性に対する金属イオン(カルシウムイオン)濃度の影響

実験は、前記(3)と同様にELISA法で行なった。

結合性がカルシウムイオンの当該濃度域で濃度に依存して減少する特性を有していることが明かになった。

抗F VIIモノクローナル抗体を用いた免疫吸着クロマトグラフィーによるF VII及びF VII aの調製

(1).免疫吸着クロマトグラフィーの調製

交差結合アガロースゲルであるセファロースCL 4 Bを担体として常法、例えば J. Porath et al., J. Chromatography, 86, p. 53, (1973)に記載された方法に準じて、第4表中クローンNo. 3で規定される(寄託番号 FERM P-10834)ハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体を固定化した。

(2). F VIIの調製

クリオプレシビテートを除去したヒト新鮮凍結血漿から陰イオン交換処理によりProthrombin family rich画分を溶出し、ポリエチレングリコール(PEG)処理により沈澱濃縮した。この沈澱

前記(1)で精製したF VIIをマイクロタイタープレートにコーティングした。

CaCl₂をそれぞれの濃度含有するように調整した10mM トリス-塩酸(pH=7.5) 0.5M NaCl、0.1% Tween 20からなる緩衝液を調製し、マイクロプレートの各列を各々の濃度のカルシウムイオンを含む緩衝液でそれぞれ4回ずつ洗浄した。以下、ウシ血清アルブミンによるブロッキング、モノクローナル抗体の第2抗体の添加及び発色の手順は、前記(3)と同じである。10mMのカルシウムイオン存在下での結合率を100%とした場合の、各イオン濃度存在下での相対結合率を第5表に表す。

第5表

カルシウム濃度	0.1 μM	1 μM	30 μM	150 μM	900 μM	1mM	3mM	10mM
結合率(%)	0	10	30	50	80	100	100	100

この結果、本願発明のモノクローナル抗体は、1 mM以下のカルシウムイオンの存在でF VIIまたは(および)F VII aに対して特異的な結合性を有し、該

をプロテアーゼインヒビター存在下、0.05M Tris、0.15M NaCl pH7.4緩衝液で溶解し、最終濃度5 mMになるようにCaCl₂を添加し、0.05M Tris 0.15M NaCl 5 mM CaCl₂ pH7.4緩衝液で平衡化した(1)で調製したコンフォメーション特異性抗F VIIおよび(または)F VII aモノクローナル抗体カラムに通液し、平衡化緩衝液で洗浄後、0.05M Tris、0.15M NaCl、10mM EDTA、pH7.4緩衝液で溶出した。溶出画分はF VII以外にわずかな夾雑物を認めたが、更なるDEAE-Sapharoseクロマト処理によりSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一バンドのF VIIとなった。なお、すべての工程は4℃で行なった。

(3).新鮮血漿からのF VIIの迅速調製

新鮮血漿にEGTAを最終濃度2.13mMになるように添加し、200mMマレイン酸でpHを6.8に調整する。この時、血漿中の遊離のカルシウムイオン濃度は約30 μMに制御される。この状態では血漿は殆ど凝固しない。こうして処理された血漿を、30 μM CaCl₂/50mM トリスマレイン酸バッファー

pH6.8で平衡化した、上記(1)で調製した免疫吸着体に通液し、同バッファーで洗浄後、10mM EDTA/50mM トリスマレイン酸バッファー pH6.8で溶出すると、SDS-PAGEで均一なバンドを示すより天然の状態に近いF VIIaが好適に調製される。

(4). F VIIaの調製

クリオプレシビテートを除去した新鮮凍結血漿から陰イオン交換処理によりProthrombin family rich画分を溶出し、ポリエチングリコール(PEG)処理により沈澱・濃縮した。この沈澱をpH7.4、0.05M Tris緩衝液(0.15M NaCl、5mM CaCl₂含有)により室温で溶解後、上記緩衝液で平衡化したコンフォメーション特異性抗F VIIおよび(または)F VIIaモノクローナル抗体カラムに通液し、平衡化緩衝液で洗浄後、pH7.4 0.05M Tris緩衝液(0.15M NaCl、10mM EDTA含有)で溶出した。溶出画分はF VIIa以外にわずかな夾雑物を認めたが、更なるDEAE-Sephacroseクロマト処理により、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一バンドのF VIIaとなった。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の方法に従いF VIIおよび(または)F VIIaを精製する時のクロマトグラフィーの溶出パターンを示すものである。

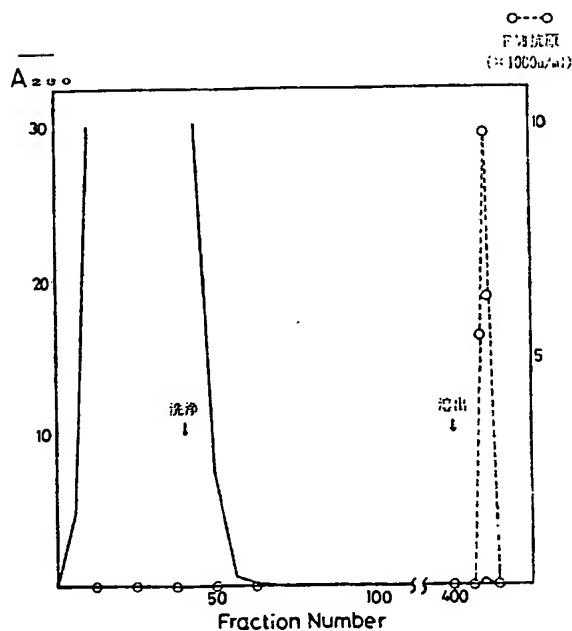
第2図は、本発明の方法に従って調製されたF VIIaのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示し、NRは非還元状態の試料、Rは還元処理後の試料、MW マーカーは分子量マーカーを表す。

なお、この蛋白がF VIIaであることは以下の証拠により明かである。

- ①50単位/μgの比活性を有し、これはF VIIと比較して25-30倍アップしている。
- ②SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により還元型で2本鎖となり、その分子量が一致する。
- ③アミノ酸配列の成績からArg¹⁵²-Ile¹⁵³の結合の切断が認められる。

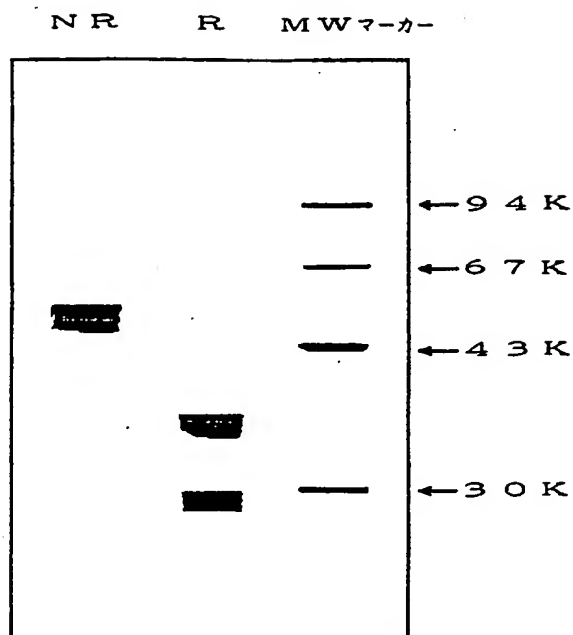
なお、血液凝固第VII因子の活性測定は以下の方法に従った。

血液凝固第VII因子欠乏血漿を用いたプロトロンビン(P.T)時間法(参考文献 Methods Enzymol. 80, 228-237, 1981)により測定した。すなわち、欠乏血漿0.1ml、希釈試料0.1ml、組織トロンボプラスチン溶液0.1mlを2分間インキュベートし、0.025M CaCl₂溶液0.1mlを添加後、凝固するまでの時間を測定する。予め、希釈試料の代わりに段階希釈した正常血漿を用いて標準曲線を作成しこれより試料中の第VII因子活性を測定する。



抗F VIIモノクローナル抗体を用いてのイオン交換クロマトグラフィー

図1



第 2 図

第 1 頁の続き

⑤Int. Cl. 9

// A 61 K 37/465
39/395
C 12 N 5/20
15/06
(C 12 P 21/08
C 12 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

N

8615-4C
8829-4C

手続補正書(方式)

平成2年7月18日



特許庁長官 吉田 文 毅 殿

6. 補正の対象

- 1) 願書の発明の名称の欄
- 2) 願書の発明者の住所の欄
- 3) 明細書の発明の名称の欄
- 4) 代理権を証明する書面

7. 補正の内容

- 1) 願書の発明の名称: 別紙のとおり
- 2) 願書の発明者の住所: 別紙のとおり
- 3) 明細書の発明の名称:
"血液凝固第Ⅶ因子または(および)活性型血液凝固第Ⅶ因子の調製方法"を「血液凝固第Ⅶ因子または活性型血液凝固第Ⅶ因子の調製方法」と訂正する。
- 4) 代理権を証明する書面: 別紙のとおり

1. 事件の表示

平成1年 特許願 1-286944

2. 発明の名称

血液凝固第Ⅶ因子または活性型血液凝固第Ⅶ因子の調製方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 シミマチカク
熊本県熊本市清水町大塚668番地

氏名 財団法人 化学及血清療法研究所
(名称)

代表者 ノ 中 野 貴 男

4. 代理人

住所 シミマチカク
熊本県熊本市清水町大塚668番地
財団法人 化学及血清療法研究所内
〒860 電話 0968(37)3100

氏名 弁理士(8767) 簡 井 知



5. 補正命令の日付(発送日)

平成2年6月26日

